

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Michaela Kašparová

Školitelé: Prof. RNDr. Lenka Skálová, Ph.D., Erkki Järvinen, M.Sc. (Pharm.)

Název diplomové práce: Syntéza glukuronidů epitestosteronu a 4-hydroxyestronu pomocí rekombinantních lidských UDP-glukuronosyltransferas

Steroidní hormony tvoří důležitou součást lidského endokrinního systému a účastní se celé řady fyziologických i patologických procesů. Biotransformační reakce I. a II. fáze mění tyto lipofilní, biologicky aktivní látky na neaktivní, ve vodě rozpustné metabolity, které jsou snadno vylučitelné do žluči nebo moči. Jednou z nejběžnějších biotransformačních reakcí II. fáze je konjugace s kyselinou glukuronovou, která je umožněna katalytickou aktivitou UDP-glukuronosyltransferas (UGTs). Tato studie je zaměřena na vývoj a optimalizaci enzymatické metody využitelné pro produkci konjugátů kyseliny glukuronové a dvou přirozeně se vyskytujících steroidních hormonů, epitestosteronu a 4-hydroxyestronu. Jako katalyzátor pro produkci 17-glukuronidu epitestosteronu a 4-glukuronidu 4-hydroxyestronu byla použita rekombinantní lidská UGT2B7, zatímco syntéza 3-glukuronidu 4-hydroxyestronu byla uskutečněna pomocí izoformy UGT1A10. Měřítka syntetických reakcí bylo nastaveno tak, aby syntetizované metabolity dosahovaly miligramových množství. Výchozí reakční produkt byl podroben kapalinové extrakci, extrakci na pevné fázi a purifikaci pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Čistý produkt enzymatické syntézy se pohyboval v rozmezí 5,19 – 6,67 mg a představoval 44,9 – 69,9 % teoretického výtěžku. Závěrečné analýzy provedené s využitím metod vysokoúčinné kapalinové chromatografie a spektroskopie nukleární magnetické rezonance potvrdily předpokládanou strukturu a indikovaly vysokou čistotu syntetizovaných glukuronidů. Tato metoda poskytuje základ pro účinnou produkci steroidních β -glukuronidů, jmenovitě 17-glukuronidu epitestosteronu, 3-glukuronidu 4-hydroxyestronu a 4-glukuronidu 4-hydroxyestronu, které svou vysokou čistotou vyhovují použití v budoucích metabolických studiích.